

米诺环素对急性视神经炎视神经轴突及 Caspase-3 表达的影响

张 静¹, 李平华²

作者单位:¹(637000)中国四川省南充市,川北医学院附属医院眼科;²(400016)中国重庆市,重庆医科大学附属第一医院眼科
作者简介:张静,硕士,研究方向:白内障、青光眼、视神经疾病。
通讯作者:李平华,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:白内障、青光眼. azhang777@yahoo. com. cn
收稿日期:2011-05-26 修回日期:2011-06-27

Effects of minocycline on optic nerve axons and Caspase-3 expression of experimental optic neuritis in rats

Jing Zhang¹, Ping-Hua Li²

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchang 637000, Sichuan Province, China;
²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Correspondence to: Ping-Hua Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. azhang777@yahoo. com. cn
Received: 2011-05-26 Accepted: 2011-06-27

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of minocycline on optic nerve axons and Caspase-3 expression of experimental optic neuritis in Wistar rats.
• **METHODS:** Twenty-two female experimental Wistar rats were assigned to four groups randomly: normal group and experimental autoimmune encephalomyelitis group (EAE group), minocycline group, methylprednisolone group (MP group). The pathological changes of optic nerve were observed and the expression of Caspase-3 in retinal ganglion cells (RGCs) was detected by immunohistochemistry.
• **RESULTS:** In EAE group, the optic nerve fibers showed bulb-like degeneration, the axis irregular swelling, a quantity of inflammatory cell infiltrating under light microscope. The axons showed bulb-like degeneration, myelin sheaths were loose, microtubule and microfilament disappeared under electron microscopy. The area percentage of axons; there was very significant difference ($P < 0.01$), when EAE group, minocycline group and MP group compared with normal group. There was

significant difference ($P < 0.05$), when minocycline group and MP group compared with EAE group. In normal rats, there was little expression of Caspase-3 in retina. There was significant difference ($P < 0.05$), when EAE group and MP group compared with minocycline group. There was significant difference ($P < 0.05$), when MP group compared with EAE group

• **CONCLUSION:** Methylprednisolone can reduce demyelinating optic nerve axons injury, but can not reduce the expression of Caspase-3 in RGCs. Minocycline can down-regulate the expression of Caspase-3 in retina, which show that minocycline has a marked protection of RGCs in demyelinating optic neuritis by inhibiting the expression of Caspase-3.

• **KEYWORDS:** optic neuritis; minocycline; methylprednisolone; optic nerve axons; Caspase-3

Zhang J, Li PH. Effects of minocycline on optic nerve axons and Caspase-3 expression of experimental optic neuritis in rats. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(8):1337-1339

摘要

目的:探讨米诺环素对急性视神经炎的影响,并与甲基强的松龙比较。
方法:雌性 Wistar 大鼠 22 只随机分为正常组、EAE 组、米诺环素组、甲基强的松龙组 (MP 组)。观察视神经病理改变,免疫组织化学法检测视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 中 Caspase-3 蛋白表达。
结果:EAE 组视神经光镜下表现为神经纤维空泡样变性,轴突不规则肿胀,大量炎性细胞浸润。EAE 组、米诺环素组、MP 组与正常组视神经轴突占横切面积比例相比,差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$),米诺环素组、MP 组与 EAE 组间的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。正常大鼠视网膜几乎未见 Caspase-3 蛋白表达,EAE 组、MP 组与米诺环素组间的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),MP 组与 EAE 组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。
结论:甲基强的松龙可减轻脱髓鞘性视神经炎轴突损伤,但不能减少 RGCs 中 Caspase-3 的表达。米诺环素可下调 Caspase-3 在视网膜中表达,提示米诺环素可通过抑制 RGCs 中 Caspase-3 活性,介导对脱髓鞘性视神经炎 RGCs 的保护作用。
关键词:视神经炎;米诺环素;甲基强的松龙;视神经轴突;Caspase-3

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 08. 009

张静,李平华. 米诺环素对急性视神经炎视神经轴突及 Caspase-3 表达的影响. 国际眼科杂志 2011;11(8):1337-1339

0 引言

视神经炎是临床上主要致盲眼病之一,发病原因尚不清楚。糖皮质激素是目前临床上用于治疗急性视神经炎的经典药物,但近年来很多研究显示,糖皮质激素并不能达到直接的神经保护作用^[1,2],Diem 发现糖皮质激素对视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的存活呈负相关。米诺环素(minocycline)是一种半合成的四环素类抗生素,可有效通过血-脑脊液屏障。近年来多项研究显示,米诺环素除具有抗炎、免疫抑制作用外,其在多种神经疾病模型中显示一定的神经元保护作用^[3,4]。但米诺环素对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experiment autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠视神经炎有无预防或治疗作用则尚未见报道。本实验旨在探讨米诺环素对 EAE 大鼠视神经炎的影响,为研究临床使用药物提供可靠的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 米诺环素(美国 Sigma 公司)、减毒百日咳菌苗(上海生物制品研究所)、完全福氏佐剂(complete freunds adjuvant, CFA, 美国 Sigma 公司)、豚鼠脊髓生理盐水匀浆(自备)、兔抗 Caspase-3 多克隆抗体(武汉博士德生物公司)、SABC 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法 雌性 Wistar 大鼠 22 只,6~8 周龄,体质量为 150~200g,随机分为正常组、EAE 组,米诺环素组和甲基强的松龙组(MP 组),其中 EAE 组 7 只,其余每组各 5 只。EAE 动物模型制备^[5]:用豚鼠脊髓与 CFA 制成的抗原匀浆四足足垫皮下 0.4mL/只,同时足背皮内注射百日咳疫苗 0.1mL/只。米诺环素组自免疫后第 8d 起每天 ip 米诺环素 45mg/kg,MP 组自免疫后第 8d 起每天 ip 甲基强的松龙 20mg/kg。临床分级按照 Zhang 等^[6]的标准,以发病 1 分以上作为 EAE 临床发病。各组大鼠在免疫后 18d 用 40g/L 多聚甲醛心脏灌注处死,取出全眼视神经及眼球,用预冷的 40g/L 的多聚甲醛固定 12~24h。常规石蜡包埋切片,以 HE 染色观察视神经病理改变,视神经轴突 Bielschowsky 染色测定轴突占视神经横截面面积比例^[7],免疫组化染色测定 RGCs 中 Caspase-3 的表达。光镜下观察,视神经横切面镀银染色背景呈浅棕色,轴突呈黑色。每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),计算机图像分析系统根据轴突区与结缔组织区的色差不同,计算轴突所占面积百分比,取平均值。光镜下观察 Caspase-3 阳性反应呈棕黄色,每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),计算阳性反应数,取平均值。

统计学分析:各指标以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,两组间采用独立样本 *t* 检验,多组之间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 临床评分 EAE 组、米诺环素组、MP 组分别为 3.12 ± 1.00 , 1.51 ± 0.62 , 1.21 ± 0.86 ,米诺环素组和 MP 组、EAE 组比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 视神经病理改变 正常视神经横切面呈类圆形,神经纤维束呈柱形均匀排列,染色均匀,其间有散在的神经胶质细胞,无炎细胞浸润。EAE 组大鼠视神经轴突变性降解,网状分层形成大量的空泡,淋巴细胞、单核细胞大量浸润,神经纤维变细小,断裂不连续,轴突数目较正常明显减少,弥漫脱髓鞘改变。米诺环素组和 MP 组较 EAE 组炎性细胞浸润减少。

2.3 轴突占视神经横截面面积比例 正常组轴突约占横截面比例为 91.65%。EAE 组视神经轴突明显疏松,结构紊乱,组织溶解,轴突比例约为 26.18%,和正常组相比差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。米诺环素组和 MP 组轴突疏松、空泡化明显,轴突占横截面比例分别约为 51.09% 和 54.12%,和 EAE 组间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 节细胞 Caspase-3 蛋白表达 正常大鼠视网膜几乎未见 Caspase-3 阳性细胞表达,EAE 组与 MP 组 RGCs 内 Caspase-3 阳性细胞表达明显增加,分别约为 0.52 ± 0.21 和 0.69 ± 0.47 ,与米诺环素组(0.31 ± 0.47)间差异有统计学意义($P < 0.05$),MP 组与 EAE 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

在本实验中,我们发现给予脱髓鞘性视神经炎大鼠甲基强的松龙和米诺环素干预后,大鼠临床症状评分显著降低,视神经轴突面积增加明显,提示甲基强的松龙和米诺环素均能改善 EAE 大鼠临床症状,有效保护视神经轴突。有学者认为视神经炎时炎性细胞破坏血-视网膜屏障,直接侵入视神经视网膜引起 RGCs 凋亡,他们认为 RGCs 凋亡是继发于炎性细胞浸润之后,由炎症细胞引起^[8]。甲基强的松龙和米诺环素均具有强抗炎、抗氧化和免疫调节抑制作用,能减轻急性病变组织炎症和水肿,恢复血-脑屏障、血-视网膜屏障的完整性,改善血循环,增加血流量,从而较好地逆转了神经传导阻滞,减轻脱髓鞘程度,促进髓鞘修复,改善脱髓鞘区的神经传导功能^[9],缩短视神经炎急性发作时功能障碍的恢复时间。

也有学者认为,RGCs 凋亡并非炎症引发的髓鞘脱失而导致的继发性神经元损伤,在视神经炎早期就出现了 RGCs 丢失^[10]。不管是何种原因所致,针对各种炎性细胞的治疗仍然是目前临床上视神经炎的主要治疗手段。糖皮质激素是临床上用于治疗急性视神经炎的经典药物,但近年来很多研究显示,糖皮质激素并不能到达直接的神经保护作用^[3,4],Diem 发现糖皮质激素可以上调 Caspase-3 蛋白的表达,从而对 RGCs 的存活产生负面影响。Caspase 是细胞凋亡中起关键作用的一组半胱氨酸蛋白酶,其中 Caspase-3 是介导细胞凋亡的核心蛋白酶,被称为“凋亡的主要执行者”^[11]。Cid 等^[12]发现,在源于多发性硬化症

(MS)患者的脑脊液中培养的神经元,表达 Caspase-3 活性和 TUNEL 阳性的神经元数目明显高于对照组。Caspase-1 抑制剂 Ac-YVAD-CMK 和 Caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CMK 能使这些神经元的细胞凋亡率由 $(39 \pm 1.4)\%$ 分别降至 $(25 \pm 1.3)\%$ 和 $(26 \pm 2.0)\%$ 。本实验中发现,EAE 组 RGCs 中 Caspase-3 蛋白表达明显增多,用米诺环素后,RGCs 中 Caspase-3 蛋白表达较 EAE 组也明显减少,差别有统计学意义($P < 0.05$),而 MP 组 RGCs 中 Caspase-3 蛋白表达显著增加,与 EAE 组及米诺环素组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。本研究提示,米诺环素可以减少脱髓鞘性视神经炎 RGCs 中 Caspase-3 蛋白合成,从而降低 RGCs 凋亡。

本实验观察到,EAE 大鼠视神经上不同程度炎性细胞浸润,提示炎性细胞参与了急性视神经炎的发生,在视神经及神经节细胞的损伤中扮演着重要角色。甲基强的松龙虽然抑制了视网膜上炎症因子的表达,但未能减少 RGCs 中 Caspase-3 表达,从而未显示对 RGCs 的直接保护作用。米诺环素除具有抗炎、免疫抑制作用,还可以减少 Caspase-3 的表达,抑制 RGCs 凋亡^[13],因此米诺环素可以作为甲基强的松龙治疗脱髓鞘性视神经炎的辅助药物,增强神经保护。但米诺环素联合甲基强的松龙治疗,其用药剂量、时间、副作用及远期效果等还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Hickman SJ, Kapoor R, Jones SJ, et al. Corticosteroids do not prevent optic nerve atrophy following optic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(8):1139-1141
- 2 Parry A, Corkill R, Blamire AM, et al. Beta-Interferon treatment does not always slow the progression of axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003;250(2):171-178
- 3 Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, et al. Neuroprotection by

minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 2003;126(Pt7):1628-1637

4 Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 2001;166(12):7527-7533

5 陈昆明,李剑敏,朱振国.豚鼠脊髓匀浆诱发大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎模型.温州医学院学报 2005;35(4):304-305

6 Zhang GX, Yu S, Gran B, et al. Glucosamine abrogates the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of Th2 response. *J Immunol* 2005;175(11):7202-7208

7 陈尚采,孙曼罗.临床病理组织与免疫组化诊断学.上海:上海医科大学出版社 1999:487

8 Shindler KS, Ventura E, Dutt M, et al. Inflammatory demyelination induces axonal injury and retinal ganglion cell apoptosis in experimental optic neuritis. *Exp Eye Res* 2008;87(3):208-213

9 Lee SM, Yune TY, Kim SJ, et al. Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF-alpha expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. *J Neurochem* 2004;91(3):568-578

10 Meyer R, Weissert R, Diem R, et al. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 2001;21(16):6214-6220

11 李小明,孙志贤.细胞凋亡中的关键蛋白酶—Caspase-3.国外医学分子生物学分册 1999;21(1):6-9

12 Cid C, Alvarez-Cermeno JC, Regidor I, et al. Caspase inhibitors protect against neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2003;136(1-2):119-124

13 Levkovitch-Verbin H, Kalev-Landoy M, Habet-Wilner Z, et al. Minocycline delays death of retinal ganglion cells in experimental glaucoma and after optic nerve transection. *Arch Ophthalmol* 2006;124(4):520-526